

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-83784

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月26日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号  
 G 0 1 N 27/28 3 2 1  
 C 1 2 Q 1/00  
 G 0 1 N 27/327  
 I 1 0 1 L 49/00

F I  
 G 0 1 N 27/28 3 2 1 F  
 C 1 2 Q 1/00 B  
 H 0 1 L 49/00 Z  
 G 0 1 N 27/30 3 5 3 J

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平9-252642

(22) 出願日 平成9年(1997) 9月3日

(71) 出願人 000004226

日本電信電話株式会社

東京都新宿区西新宿三丁目19番2号

(71) 出願人 000102739

エヌ・ティ・ティ・アドバンステクノロジー株式会社

東京都武蔵野市御殿山1丁目1番3号

(72) 発明者 丹羽 修

東京都新宿区西新宿三丁目19番2号 日本電信電話株式会社内

(74) 代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微量オンラインバイオセンサー及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 従来の問題点を解決した微量オンラインバイオセンサー、及びそのセンサーの常温での製造方法を提供する。

【解決手段】 矩型の溝でなる微小流路が形成された絶縁性基板と、別の基板上に形成された薄層電気化学セルを張合せた構造を有し、前記微小流路にフローセルとサンプリング用のキャピラリーあるいはマイクロダイヤリシスプローブが接続されている微量オンラインバイオセンサー。矩型の溝でなる微小流路を絶縁性の基板に形成し、該微小流路にサンプリング用のキャピラリー、あるいはマイクロダイヤリシスプローブを接続し、もう一方の基板に薄膜電極、及び薄層流路を形成し、少なくとも一つの電極の上面を、触媒作用を有する物質により修飾した後、微小流路を有する基板と常温で張合せる微量オンラインバイオセンサーの製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 矩型の溝でなる微小流路が形成された絶縁性基板と、別の基板上に形成された薄膜電気化学セルを張合せた構造を有し、前記微小流路にフローセルとサンプリング用のキャピラリーあるいはマイクロダイヤリシスプローブが接続されていることを特徴とする微量オンラインバイオセンサー。

【請求項2】 請求項1において薄膜電気化学セルが、絶縁性基板上に形成された薄膜電極とその回りに形成された薄膜流路からなることを特徴とする微量オンラインバイオセンサー。

【請求項3】 請求項2において、少なくとも一つの電極の上面が、触媒作用を有する物質により修飾されていることを特徴とする微量オンラインバイオセンサー。

【請求項4】 矩型の溝でなる微小流路を絶縁性の基板に形成し、該微小流路にサンプリング用のキャピラリー、あるいはマイクロダイヤリシスプローブを接続し、もう一方の基板に薄膜電極、及び薄膜流路を形成し、少なくとも一つの電極の上面を、触媒作用を有する物質により修飾した後、微小流路を有する基板と常温で張合せることを特徴とする微量オンラインバイオセンサーの製造方法。

【請求項5】 請求項1に記載の方法において、常温で基板と張合せる工程を、光硬化性接着剤、ポリマー薄膜を溶媒蒸気で溶解させたもの、あるいは低融点ガラス薄膜を用いて張合せることにより行うことを特徴とする微量オンラインバイオセンサーの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、培養細胞や生体内の微小部分から微量の試料を採取し、それを連続的に定量分析するためのバイオセンサーに関する。

## 【0002】

【従来の技術】神経科学や分子生物学などの研究において、生体内の微小領域に含まれる生理活性物質をリアルタイムで計測しようという試みが数多くなされている。その中で電気化学的な分析法は、(1)微量量の計測に適している、(2)感度が比較的高い、(3)選択的な膜や酵素などで電極を修飾することにより、高選択的な測定が可能である、(4)簡便で低価格のセンサーを作製することができるなどの特徴を有している。生体を生かしたまま直接、電気化学的に生理活性物質を測定する試みとしては、炭素繊維電極などの微小電極を直接生体内の特定領域に挿入して、その場計測を行うか、又はマイクロダイヤリシスプローブと呼ばれる1～5mm程度の微小な透析膜を生体中に挿入し、ポンプにより透析液を送って、生体に含まれる生理活性物質を膜を介してサンプリングし、オンラインで電気化学センサーに送達することにより生体物質をリアルタイム計測している。セ

物質を生成する酵素膜などを修飾した電極を用いることにより、グルコース、ラクトースなどの糖類、グルタミン酸などの神経伝達物質がリアルタイムで計測されている。一方、培養細胞などの計測では細胞一個の計測など、超微量の試料の測定が要求されている。微小電極法では直径数 $\mu\text{m}$ の炭素繊維電極が容易に利用できるために、カテコールアミンなど電極で直接電気化学反応して計測できる神経伝達物質などでは単一細胞レベルの計測が行われている〔例えば、T. J. シュレーダー (T. J. Schroeder)、J. A. ジャンコフスキー (J. A. Jankowski)、K. T. カワゴエ (K. T. Kawagoe)、R. M. ワイトマン (R. M. Wightman)、C. レフロウ (C. Lefrou)、及びC. アマトア (C. Amatore)、アナリチカル ケミストリー (Analytical Chemistry)、第64巻、第3077～3083頁(1992)〕。また、走査型電気化学顕微鏡を利用してマイクロメータオーダーの微小領域での酵素反応や免疫反応の検出が試みられている〔例えば、H. シク (H. Shiku)、T. マツエ (T. Matsue)、及びI. ウチダ (I. Uchida)、アナリチカル ケミストリー、第68巻、第1276～78頁(1996)〕。更に、前述したオンライン型のセンサーにおいても微小なガラスキャピラリーあるいはマイクロダイヤリシスプローブと酵素修飾電極をセットした微量容量のフローセルを組合せたセンサーが作製されている。また、更に微量のオンラインセンサーの作製法として、シリコンやガラス基板上に、マイクロマシン技術、例えば異方性エッチングやドライエッチング法を用いて溝を作製し、薄膜電極を有する基板と融着して微小流路を形成した後、内部に酵素を固定化した微量容量のセンサーが報告されている〔例えば、Y. ムラカミ (Y. Murakami)、T. タケウチ (T. Takeuchi)、K. ヨコヤマ (K. Yokoyama)、E. タミヤ (E. Tamiya)、及びI. カルベ (I. Karube)、アナリチカル ケミストリー、第65巻、第2731～2735頁(1993)〕。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】単一細胞など生体試料の微量量の物質を測定する場合、ファイバー型の微小電極では、単一細胞レベルでのサイズまで容易に微小化でき、電気化学反応を容易に起こす化合物については、極めて微量まで検出することができる。しかしながら、電気化学反応を起こさず、酵素反応と電極反応を組合せて測定を行う系では微小電極上に固定化できる酵素量が少なく、利用する酵素によっては長期安定性に劣る。また、共存物質が存在する系では、その影響をすべて電極上で除く必要があるため、高い選択性を得るのが困難であるなどの欠点を有している。また、酵素反応に補酵素などの物質が必要な場合測定を行う培養系にその物質を加える必要があり、その生体試料への影響を常に考慮する必要があった。一方、オンライン型のセンサーでは、

セルを使用した場合、サンプリング速度を遅くすると、サンプリングプローブ先端から電気化学検出器までの容量が大きいため、遅れ時間が大きく、センサーの応答性や時間分解能が低下する欠点があった。一方、マイクロマシン技術を利用して作製したセンサーでは、作製時に微小流路に電極を配置して作製するが、流路の形状が小さいため、電極面積も大きくすることが難しく、(1)大きな電流を得ることができない、(2)流路中に多数の電極を並列に配置するのが難しい、などの欠点があった。ユーイング(Ewing)らは、マイクロマシンで薄膜型の流路を作製し、その中に多数の並列型アレイ電極を配置し、キャピラリー電気泳動の電気化学検出器として使用している。しかしながらこの方法では、シリカキャピラリーなどの細管と平面型の流路の構造が大きく異なるためにサンプリング用のキャピラリーと薄膜流路を密閉状態で、デッドボリュームを減らして接続するのは難しい。また、センサーをマイクロマシン技術により作製する際に、通常、微小溝を形成した基板と電極を形成した基板を張合せて作製するが、その際に比較的高い温度と高電圧を必要とするため、酵素などの生体分子を2つの基板を張合せる前に生体材料を固定化しておくとも熱変成などにより活性を失いセンサーの特性が低下する。本発明の目的は、前記のような目的を達成するための微量オンラインバイオセンサー、及びそのセンサーの常温での製造方法を提供することにある。

#### 【0001】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、微量オンラインバイオセンサーに関する発明であって、矩型の溝でなる微小流路が形成された絶縁性基板と、別の基板上に形成された薄膜電気化学セルを張合せた構造を有し、前記微小流路にフローセルとサンプリング用のキャピラリーあるいはマイクロダイヤリシスプローブが接続されていることを特徴とする。また、本発明の第2の発明は、微量オンラインバイオセンサーの製造方法に関する発明であって、矩型の溝でなる微小流路を絶縁性の基板に形成し、該微小流路にサンプリング用のキャピラリー、あるいはマイクロダイヤリシスプローブを接続し、もう一方の基板に薄膜電極、及び薄膜流路を形成し、少なくとも一つの電極の上表面を、触媒作用を有する物質により修飾した後、微小流路を有する基板と常温で張合せることを特徴とする。

#### 【0005】

【発明の実施の形態】以下、本発明を具体的に説明する。本発明の第1の発明の微量オンラインバイオセンサーにおける具体的な実施の態様としては、下記のもの挙げられる。第1の発明において薄膜電気化学セルが、絶縁性基板上に形成された薄膜電極とその回りに形成された薄膜流路からなることを特徴とする。上記発明において、少なくとも一つの電極の上表面が、触媒作用を

記した触媒作用を有する物質の例としては、酵素やメディエータ等が挙げられる。

【0006】また、本発明の第2の発明の具体的な実施の態様としては、当該常温で基板と張合せる工程を、光硬化性接着剤、ポリマー薄膜を溶媒蒸気で溶解させたもの、あるいは低融点ガラス薄膜を用いて張合せることにより行うことを特徴とする微量オンラインバイオセンサーの製造方法が挙げられる。

【0007】本発明のオンラインバイオセンサーの1例の構造を図1に見取図として示す。センサーはマイクロマシン技術で形成した矩型の溝を有する基板1と酵素などが修飾された薄膜電極2、及びそれを取り囲むように形成された薄膜型レジスト膜3を張合せた構造を有するために、センサー出入り口では、サンプリングのためのキャピラリー4やマイクロダイヤリシスプローブを容易に接続することができる。また、電極部分は幅が広く、厚みが薄い薄膜セル中に形成されるため、電極面積をセンサーの容積を著しく増大させることなく増加させたり複数の電極を薄膜流路中に並列に配置することができる。更に、薄膜セルでは矩型のセルに比較し、分析対象物質が電極表面と接触して反応する効率が増加する。その結果高い感度を得ることができる。更に、溝を形成した基板と電極、及び薄膜セルを形成した基板を常温で張合せるために、酵素を電極上に先に固定することができる。流路を形成した後、酵素を充てんする方法に比較し、製造が容易で、フローセルの任意の場所に異なる種類の酵素を選択的に固定化することができる利点を有する。

#### 【0008】

【実施例】以下、図面を参照して本発明を実施例により更に具体的に説明する。なお本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

#### 【0009】実施例1

図2は、本発明によるオンラインバイオセンサーの一実施例によるセンサーの製造工程を示す。製造工程は、矩型流路を有する基板と、薄膜流路及び電極を有する基板の作製工程に分けて示す。なお、図2において、符号11はスライドガラス、12は矩型の溝、13はヒューズドシリカキャピラリー、14はガラス基板、15はカーボン薄膜、16はレジスト、17はグルタミン酸酸化酵素膜、18は西洋ワサビペルオキシターゼを含むオスミウムポリビニルピリジン膜、19は銀を意味する。まず、矩型流路を有する基板では、スライドガラスをダイシングソー(ディスコ社製)を用いて角幅10mm、長さ26mmに切断し、短い辺と平行に同じくダイシングソーにより17mm間隔を開けて、2本の矩型流路を形成した。矩型流路の幅、深さ共に400 $\mu$ mとした。溝にサンプリング用のキャピラリー(内径75 $\mu$ m、外径375 $\mu$ m)とシリンジポンプに接続するためのキャピラリー(内径15 $\mu$ m、外径275 $\mu$ m)を接続し、

瞬間接着剤(アロンアルファ)により仮止めした。また、サンプリング用キャピラリー及びシリンジポンプに接続したキャピラリーを接続した矩型の溝の反対側の出口は内部を接着剤で満たしたキャピラリーを接着し埋めた。

【0010】図3にキャピラリーを取付けた基板の見取図を示す。なお、図3において、符号21はサンプリングキャピラリー、22は矩型流路を形成したガラス基板、23はアウトレット用ヒューズドシリカキャピラリー、24は内部を塞いだキャピラリーを意味する。図3中、符号21で表されるサンプリングキャピラリー部分は、外径0.375mm、内径25 $\mu$ mのヒューズドシリカキャピラリー(GIサイエンス社製)の先端をフッ酸40%水溶液に浸漬し、内部を加圧して外部のみをエッチングして先端を細くしたものである。次に、石英ウエハ上に熱CVD法により炭素薄膜(膜厚100nm)を形成した。CVD法は石英基板をガラス管内において1000°Cに加熱し、出発物質としてフタロシアニンをを用い、400°Cで昇華、ウエハ上で熱分解させる方法を用いた。炭素膜が形成されたウエハ上にシリコン系酸素ドライエッチング(RIE)用フォトレジスト(NTT-AT社製)をスピナー(ミカサ社製)により4000回転で塗布した。その後、フォトマスクをウエハに重ね、マスクアライナーPLA-501(キャノン)を用いて3電極のボタンを露光した。露光時間は15秒とし、露光後、ウエハをアルカリ現像液中で30秒間現像し、水洗、乾燥を行った。現像後のウエハでは、電極ボタンの部分のみがレジストボタンに覆われているので、このレジスト付き基板を反応性イオンエッチング装置(DEM-451、アネルパ製)に入れ、レジストボタンをマスクにして酸素プラズマによりレジストに覆われていない部分の炭素膜をエッチングした。エッチング条件は、酸素流量100SCCM、パワー:70W、圧力:2パスカル、時間:25分とした。電極ボタンを形成した基板上に更に厚膜形成用ポジ型フォトレジスト(JSR製)をスピコートし、フォトマスクを重ねてマスクアライナーにより露光、続いてアルカリ現像を行い3つの電極部分を取囲むように幅3mm、長さ16mmの薄層流路部分と、パッド部分を露出させた。

【0011】電極基板の見取図を図4に示す。なお、図4において、符号31は作用電極(HRPを含むポリビニルピリジン誘導体膜、及びグルタミン酸酸化酵素を固定化した牛血清アルブミン膜で修飾)、32は参照電極(銀をメッキ)、33は対向電極、34は薄層流路のためのレジストボタン、35はパッドを意味する。図4に示すように、薄膜電極は上から作用電極31、参照電極32、対向電極用薄膜33に分かれ、作用電極上には西洋ワサビペルオキシターゼ(HRP)を含むオスミウム-ポリビニルピリジン誘導体(Os-ポリマー)膜(バ

s)社製)、及びグルタミン酸酸化酵素を牛血清アルブミンと混合し、グルタルアルデヒドで架橋した膜により順に修飾した。また参照電極用基板上には参照物質として銀をメッキした。また、図中34は薄層流路のためのレジストボタン、35は端子取り出しのためのパッドを示す。点線は矩型の流路が重なる位置を示す。その後、キャピラリーを接続した矩型流路を有する基板と電極及び薄層流路を形成した基板を両方の流路が向い合うように押し当て位置合せ後、光硬化性の接着剤を両りから浸込ませた。接着剤が流路の直前まで浸込んだ時、キセノンランプを用いて光を照射し、基板を接着した。作製したセンサーを図1に示すようにシリンジポンプに接続した。また、ポテンシオスタットLC4Cの端子はそれぞれ、センサーの、参照、対向の各電極パッドの部分に接続した。測定は、シリンジポンプを用いてサンプリング用のキャピラリーから溶液を吸引しながら、作用電極に0mVの電位を印加して行った。図5はセンサーのグルタミン酸に対する応答を示す。流速2 $\mu$ l/minで溶液を吸引し、試料溶液が5 $\mu$ Mの濃度になるようにグルタミン酸溶液を加えると、グルタミン酸注入30秒後(遅れ時間)に還元電流が増加し始め、40秒後に定常状態の応答の1/2の値に達した。図6にはセンサーが応答し始めるまでの時間の流速依存性を示す。なお、図6において、縦軸は応答時間(sec)、横軸は流速( $\mu$ l/min)を示す。図6に示すように、センサーの遅れ時間は流速の増加と共に減少し、4 $\mu$ l/min以下では10秒以下の応答が得られている。同じ流速で通常のフローセルを用いた場合、遅れ時間は3分以上かかっており本センサーの応答が素早いことが分かる。また、矩型流路のみでセンサーを構成した場合、センサーの応答は2nA/10 $\mu$ Mであるのに対し、本発明のセンサーでは18nA/10 $\mu$ Mと10倍近い感度の向上が観測された。これは、本発明のセンサーでは電極部分の薄層セルの膜厚が20 $\mu$ mと薄いため(矩型流路は150 $\mu$ m)、サンプリングされたグルタミン酸が電極上の酵素膜に接触して反応する率が低いことによる。また、このセンサーは光硬化性接着剤を用いて作製し従来法(例えば陽極接合)のように、加熱する必要がないため基板を張合せた後、酵素を固定する必要がなく生産性に優れていることが分かった。更に光硬化性接着剤では適当な時期に光を照射することにより薄層流路への接着剤の流れ込みを抑制することができ歩留りも向上した。

#### 【0012】実施例2

実施例1と同様な方法により矩型流路を有する基板、及び炭素薄膜電極(3電極)と薄層フローセルを有する基板を作製した。また矩型流路を有する基板には、実施例1と同様にキャピラリーを接続した。炭素薄膜電極を有する基板上に図7に示すように酵素や銀を修飾した。な

(銀メッキ)、43は対向電極、44はHRPを含むポリビニルピリジン誘導体膜、及びコリン酸化酵素、アセチルコリンエステラーゼを固定化した牛血清アルブミン膜、45は銀、46はコリン酸化酵素、及びカタラーゼを固定したアルブミン膜を意味する。図7中、対向電極上にはコリンオキシターゼとカタラーゼを作用電極上にはアセチルコリンエステラーゼとコリンオキシターゼ膜、及びHRPを含むオスミウム・ポリビニルピリジン膜により修飾した。また、参照電極上には銀をメッキした。その後、基板を実施例1と同様な方法により張合せ微小なオンラインセンサーを作製した。試料としてアセチルコリン1  $\mu$ Mあるいはコリン10  $\mu$ M、アセチルコリン・コリン両方を含むリン酸緩衝生理食塩水を用い、シリンジポンプで溶液を吸引して測定を行った。作用電極電位は0 mV、流速は2  $\mu$ l/分とした。1  $\mu$ Mのアセチルコリン溶液をセンサーに導入すると還元電流が流れ、5 nA/ $\mu$ Mの感度が得られた。しかしながら、10  $\mu$ Mのコリンを導入しても、応答は全く得られなかった。これは、上流側のコリンオキシターゼ膜により、コリンが酸化され、発生した過酸化水素がカタラーゼにより消費されることによる。これに対してアセチルコリンは上流の酵素膜では反応せず、作用電極上のアセチルコリンエステラーゼ・コリンオキシターゼ膜により酸化され、還元電流が得られる。また、アセチルコリンとコリンを同時に導入してもアセチルコリンだけを導入した場合と大きな感度の差は観測されなかった。センサーが薄層流路部分を有するために、コリンが対向電極上に固定化されたコリン酸化酵素と発生した過酸化水素が同様にカタラーゼ膜と効率良く反応し、高い選択が得られたものと推定される。

#### 【0013】実施例3

図8は、本発明によるオンラインバイオセンサーの一実施例によるセンサーの製造工程を示す。製造工程は、矩形流路を有する基板と、薄層流路及び電極を有する基板の作製工程に分けて示す。なお、図8において、符号51はスライドガラス、52はポリスチレン膜、53は矩型の溝、54はマイクロダイヤリシスプローブ、55はガラス基板、56はレジストパターン、57は白金・チタン積層膜、58は薄層流路を構成するレジストパターン、59は酵素膜、60は銀を意味する。図8に示すように、まず、矩形流路を有する基板では、スライドガラス上にポリスチレン膜をスピンコートした。膜厚は約5  $\mu$ mとした。次にダイシングソー（ディスコ社製）を用いて角幅10 mm、長さ26 mmに切断し、図8に示すように2本の矩形流路を形成した。矩形流路の幅、深さ共に400  $\mu$ mとした。溝に微小透折用プローブ（内径75  $\mu$ m、外径375  $\mu$ m）と出口側のキャピラリー（内径150  $\mu$ m、外径375  $\mu$ m）を接続し、瞬間接着剤（アワンアルファ）により仮止めした。一方、薄膜電

作製したが、カーボン膜の代りにリフトオフ法を用いて白金薄膜電極を形成した。白金薄膜電極の具体的作製法は、まず基板上にポジ型フォトリソ（富士ハント社製）を1  $\mu$ mの厚みにスピンコートし、マスクアライナーで露光、アルカリ現像により電極パターンを形成した。その後、マグネトロンスパッタ装置（日本シード社製）にレジストパターンを有する基板を取付け、チタン、白金を順にスパッタした後、レジストをメチルエチルケトン中で超音波かけながらはく離し、白金電極パターンを形成した。更に、厚膜形成用のレジストを20  $\mu$ mの厚みにスピンコートし、マスクアライナーを用いて露光し、薄層流路用パターンを形成した。その後、基板を200℃で30分熱処理しレジストを硬化させた。図9に上面からの基板の見取図を示す。なお、図9において、符号61はグルコース酸化酵素で修飾した白金薄膜作用電極、62はラクトース酸化酵素で修飾した白金薄膜作用電極、63は参照電極（銀をメッキ）、64は対向電極、65は薄層流路のためのレジストパターンを意味する。図9に示すように、作用電極は流れに平行に2つ形成し、一方の薄膜電極上にグルコース酸化酵素を、もう一方にラクトース酸化酵素を固定化した。固定化は牛血清アルブミン2%水溶液に各酵素を250ユニット/mlになるように溶解させ、電極上に1  $\mu$ lずつキャストしたのちグルタルアルデヒド蒸気により架橋した。また、参照電極上には銀をメッキした。次に、ポリスチレン膜をコートした矩形流路を有する基板にエアブラシ（出宮社製）を用いてテトラヒドロフラン（THF）を吹付けた。表面のポリスチレンがわずかに溶解した時電極パターンを有する基板を押付け、そのままクリップで固定して乾燥させた。乾燥後、エポキシ樹脂を接合面に塗り接着の強化、及び接合面からの液漏れ防止を行った。測定溶液として、リン酸緩衝生理食塩水を用い、マイクロダイヤリシスプローブを液に浸したのち、還流液として同じリン酸緩衝生理食塩水をシリンジポンプにより流速：2  $\mu$ l/minで送液した。各酵素修飾薄膜電極の電位を500 mVとし、マイクロダイヤリシスプローブをグルコース1 mM、ラクトース100  $\mu$ Mを含む生理食塩水に入れると、50秒後に2つの作用電極で還元電流が増加した。定常状態での値はグルコース酸化酵素を固定化した電極では120 nA、ラクトース酸化酵素を固定化した電極では11.5 nAの定常状態の電流が得られた。また、グルコースのみ、あるいはラクトースのみを含む溶液を送液するとそれぞれ、一方の電流しか応答せず、これらの結果よりグルコース、ラクトースを独立に測定できていることが確かめられた。また、センサーを試料のすぐ近傍に配置することができるため、従来の機械加工で作製したフローセルを用いるセンサーに比較し、速い応答が得られる。

#### 【0014】実施例4

実施例1と同様な方法を用いて矩形流路を有する基板を

作製した。また、実施例1と同様な方法を用いて白金薄膜電極と薄層流路を有する基板を作製した。電極を酵素や参照物質で修飾した後、実施例1と同様な方法で張合せグルタミン酸検出用のセンサーを作製した。センサーの上面図を図10に示す。なお、図10において、符号71は作用電極、72は参照電極（銀をメッキ）、73は対向電極、74は薄層流路のためのレジストボタン、75はサンプリング用キャピラリー、76は電気浸透流発生のための薄膜電極、77は高電圧源、78は出口用キャピラリーを意味する。図10に示すように、薄膜電極は上から、作用電極71、参照電極72、対向電極用薄膜73に分かれ、作用電極上にはグルタミン酸酸化酵素を牛血清アルブミンと混合し、グルタルアルデヒドで架橋して修飾した。また参照電極用基板には参照物質として銀をメッキした。また、図中74は薄層流路のためのレジストボタン、また薄層流路の入口側、及び出口側にはサンプリング用キャピラリー75、及び出口用キャピラリー78が接続されている。一方76に示す薄膜電極は高圧電源（松定プレジジョン製）77に接続し、その間に電圧を印加し電気浸透流を起こすことにより溶液を駆動する。センサー内部をリン酸緩衝溶液で満たした後、サンプリング用キャピラリーをリン酸緩衝生理食塩水溶液に差込み、高電圧源に200Vの電圧を印加した。残りの3つの電極はポテンシオスタットに接続し、作用電極に500mVの電位を印加した。試料溶液のサンプリングキャピラリー先端近傍に10 $\mu$ Mのグルタミン酸100 $\mu$ lをガラスキャピラリーにて放出すると、30秒後に酸化電流が観測され、1分以内に5.2nAのピークが得られた後減少した。一方、流路をすべてキャピラリーが挿入可能な矩形流路で形成して測定を行うと、電流の立上りは90秒後に、ピーク電流の絶対値は1.1nAであった。

#### 【0015】実施例5

面方位が(110)で、500nm厚の酸化膜付きシリコン基板にポジ型レジスト（東京応化製：TSMR-V3）をスピンコートにより塗布し、90℃で2分間ホットプレート上でベーキングした後、マスクアライナー（キャノン製：PLA-600）により図11に示す流路ボタンを露光後、現像、水洗した。露光の際に流路の方向と(112)面が垂直になるようにアライメントした。次に該基板を緩衝フッ酸液（40%NH<sub>4</sub>Fと46%HF溶液を容量比85:15で混合）に5分間浸漬して酸化膜をエッチングした。水洗後、該基板をレジストリムーバー液に浸漬し、レジストをはく離した。次に該基板を温度100℃、50wt%のKOH水溶液に50分間浸漬し、幅と深さが約100 $\mu$ mのキャピラリーを埋込むための2つの溝を得た。次に該基板に溝を作製したのと同様の方法で、溝と溝を連結するように幅2mm、長さ17mm、深さ20 $\mu$ mの凹面部分を作製した。

れ、エッチングにより露出したシリコンを酸化し、表面を500nm厚の酸化膜で覆った。次に該基板をスパッタ装置（日本シード製）に入れ、低融点ガラス（いわき製：#7570）を真空度5mTorr、RFパワー500Wの条件で膜厚が0.5 $\mu$ mになるまでスパッタ堆積させた。一方、薄膜電極が形成された基板はバイレックスガラスを基板として用い、実施例3の方法で作製した。基板上にポジ型レジスト（東京応化製：TSMR-V3）でボタンを形成し、スパッタ法により白金薄膜を堆積させ、レジストをはく離することにより電極ボタンを得た。次に、実施例3とは異なり、厚膜形成用ポジ型フォトリソレジストでのボタンは形成せずに直接、一方の薄膜電極上にグルコース酸化酵素を、もう一方にラクトース酸化酵素を実施例3の方法で固定化した。陽極接合装置（ユニオン光学製：SIG-2）に該溝付き基板と薄膜電極基板をサンプリング用及び吸引用のキャピラリーと共にセットし、薄膜電極基板がマイナスになるようにして50Vの電圧を室温で10分間印加した。その後、キャピラリーと溝の隙間を紫外線硬化性接着剤でふさいだ。各酵素修飾薄膜電極の電位を0mVとし、キャピラリーのサンプリングプローブをグルコース0.2mM、ラクトース50 $\mu$ Mを含む生理食塩水に入れ、センサーをシリンジポンプで吸引すると、15秒後に2つの電極でほぼ同時に電流が増加し始めた。定常状態の電流は、グルコース酸化酵素を固定化した電極で370nA、ラクトース酸化酵素を固定化した電極で77nAの値が得られた。また、ラクトース濃度を3倍にするとラクトース酸化酵素を固定化した電極のみ還元電流が2倍に増加し、グルコース酸化酵素を固定化した電極では変化が全く見られなかった。また、センサーは、他の糖類やアミノ酸へは全く応答が見られなかった。一方、10 $\mu$ MのL-アスコルビン酸をセンサーに導入すると、3nAの酸化電流が観測された。しかしながら各酵素電極の表面にナフィオン膜をコートし、測定電位を-100mVにすることにより、電流値は1/10以下に低下した。その結果、グルコース0.2mM、ラクトース50 $\mu$ Mを含む生理食塩水にL-アスコルビン酸100 $\mu$ M加えて測定を行っても、電流値の低下は5%未満で影響を抑えることができた。ナフィオン膜の代りにセルロースアセテート膜をセンサー表面に形成しても同様の結果が得られた。

#### 【0016】実施例6

厚さ1mm、大きさ50mm×52mmのバイレックスガラス上にスパッタ装置（日本シード研究所製）により圧力5mTorr、RFパワー500Wの条件で、厚さ100nmのシリコン薄膜を堆積した。次に該基板に50 $\mu$ m厚のドライフィルムを加熱ローラーを用いて密着させ、マスクを通して紫外線を照射し、現像、水洗して2mm×17mm角の部分が抜けたボタンを2行5列に



エッチング液（フッ酸：硝酸：酢酸＝1：4：3の混合液）に浸漬して表面のシリコン薄膜をエッチングした後、フッ酸緩衝液に浸漬し、方形部分のガラスを20 $\mu$ mエッチングし、ドライフィルムをリムーバーではなく離した。次に、該基板をダイシングソーにて方形部分が中心になるように10mm $\times$ 26mmの大きさに切断すると共に、チョッパーカットにて図12と同様の形状になるように、深さ0.4mm、幅0.4mmの溝を方形部分とエッジが接続するように形成した。次に、該基板を四隅の1ヵ所を1mm角程度マスクしてスパッタ装置に装着し、実施例5と同様の条件にて低融点ガラスを1 $\mu$ mスパッタした。一方、薄膜電極基板は実施例5と同様の方法で作製し、陽極接合装置（ユニオン光学製：SIG-2）に該溝付き基板と薄膜電極基板をサンプリング用及び吸引用のキャピラリーと共にセットした。溝付き基板において、低融点ガラスのスパッタ時にマスクで覆われていてシリコン薄膜が露出している部分と陽極接合装置の負極を銅箔にて導通させ、溝付き基板がマイナスになるようにして50Vの電圧を室温で10分間印加して2つの基板を接合させた。その後、キャピラリーと溝の隙間を紫外線硬化性接着剤でふさいだ。実施例5と同様にグルコースとラクトースに対する応答を測定し、同様の結果を得た。

#### 【0017】実施例7

石英基板上に炭素薄膜電極を実施例1と同様の方法で作製したのち、該基板上にプラズマCVD法により酸化膜を500nm堆積した。次に、該基板上にスパッタ法によりシリコンを100nm堆積した後、低融点ガラスを500nm堆積した。その後、該基板にレジスト（東京応化製：TSMR-V3）を塗布し、パッド部分の反対側の隅を1mm角程度と電極部分とパッド部分がエッチングにより露出するようにレジストをパターンニングした。次に、フッ酸緩衝液で低融点ガラスをエッチングし、隅の1mm角の部分にレジストを滴下、乾燥したのち、フッ酸：硝酸：酢酸＝1：4：3の混合液に浸漬してシリコンをエッチングし、再びフッ酸の緩衝液に浸漬して炭素薄膜の電極部分とパッド部分を露出させた。次に実施例1と同様の方法でグルタミン酸酸化酵素などを電極上に固定した。一方、溝付き基板はバイレックス基板にレジストを塗布し、2mm $\times$ 17mm角の部分が抜けたボタンを形成した後、フッ酸緩衝液で20 $\mu$ mエッチングし、レジストをはく離後、方形部分とエッジが接続するようにダイシングソーでチョッパーカットして深さ0.4mm、幅0.4mmの溝を形成した。次に、陽極接合装置（ユニオン光学製：SIG-2）に該溝付き基板と薄膜電極基板をサンプリング用及び吸引用のキャピラリーと共にセットした。薄膜電極基板において、シリコン薄膜が露出している部分と陽極接合装置の負極を銅箔にて導通させ、薄膜電極基板がマイナスになるように

を接合させた。その後、キャピラリーと溝の隙間を紫外線硬化性接着剤でふさいだ。実施例1と同様にグルタミン酸に対する応答を測定し、同様の選択性を得た。

#### 【0018】比較例1

実施例7において酵素を固定化せず、低融点ガラスをつけていない薄膜電極基板を用意し、溝付き基板との接合を通常の陽極接合の条件で試みた。基板温度を450℃にし、薄膜電極基板のシリコン薄膜がプラスになるようにして10分間印加して2つの基板を接合させた。その結果、基板は接合されたが、基板が冷却されるに従い、バイレックスと石英の膨張係数の違いからひずみがかかり、バイレックスに多数のひびが入ってしまった。

#### 【0019】

【発明の効果】以上、説明したように、本発明による微小流路が形成された絶縁性基板と基板上に形成された薄膜電気化学セルを張合せた構造を有するフローセルとサンプリング用のキャピラリーあるいはマイクロダイヤリシスプローブが接続されていることを特徴とする微量オンラインバイオセンサーは、

1. 矩型流路と薄膜流路を有するために、センサー出入口では、サンプリングのためのキャピラリーやマイクロダイヤリシスプローブを容易に接続することができる。また、電極部分は幅が広く、厚みが薄い薄膜セル中に形成されるため、電極面積をセンサーの容積を著しく増大させることなく増加させたり複数の電極を薄膜流路中に並列に配置することができる。更に、薄膜セルでは矩型のセルに比較し、分析対象物質が電極表面と接触して反応する効率が增加する。その結果高い感度を得ることができる。

2. 溝を形成した基板と電極、及び薄膜セルを形成した基板を常温で張合せるために、酵素を電極上に先に固定することができ、流路を形成した後、酵素を充てんする方法に比較し、製造が容易で、フローセルの任意の場所に異なる種類の酵素を選択的に固定化することができる。

3. フッ酸によるウェットエッチングやドライエッチング装置など、危険な試薬、あるいは高価な装置と長いエッチング時間をかけずに微小なセンサーを形成することなどの効果を有する。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のオンラインバイオセンサーの1例の見取図である。

【図2】実施例1に示すセンサーの工程図である。

【図3】実施例1に示した矩型流路を有する基板とキャピラリーの詳細図である。

【図4】実施例1に示した電極基板の見取図である。

【図5】本発明の実施例1に示したセンサーのグルタミン酸に対する応答を示す図である。

【図6】本発明の実施例1に示したセンサーの応答速度を示す図である。

【図7】本発明の実施例2に示したアセチルコリンセンサーの電極の模式図である。

【図8】実施例3に示すセンサーの工程図である。

【図9】実施例3に示した薄膜電極と薄層流路を有する基板の構造の見取図である。

【図10】実施例4に示した薄膜電極と薄層流路を有する基板の構造の見取図である。

【図11】実施例5に示した2つの溝と凹面部を有する基板において溝のみのレジストパターンを示す図である。

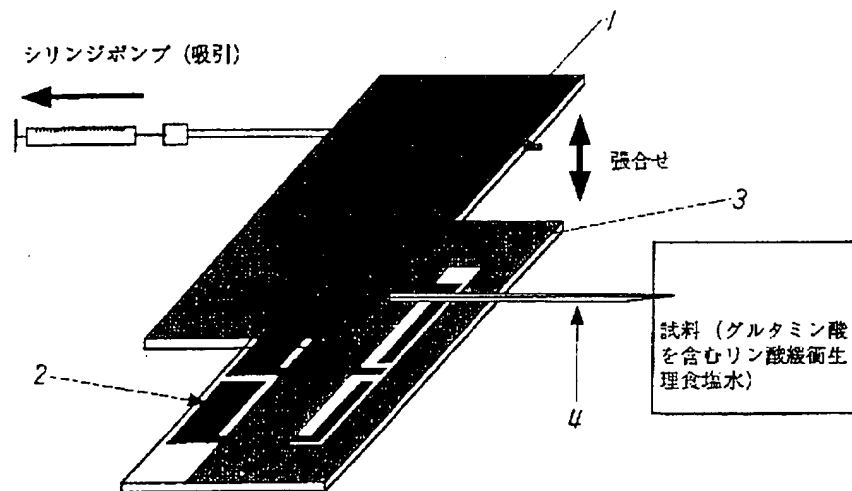
【図12】実施例5に示した2つの溝と凹面部を有する基板において、溝及び凹面部を形成した後の基板の構造を示す図である。

#### 【符号の説明】

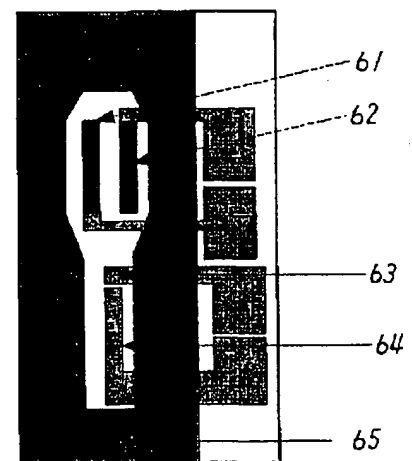
1：矩型流路を有する基板、2：炭素薄膜電極、3：薄層セルを構成するレジスト膜、4：サンプリング用キャピラリー、11：スライドガラス、12：矩型の溝、13：ヒューズドシリカキャピラリー、14：ガラス基板、15：カーボン薄膜、16：レジスト、17：グルタミン酸酸化酵素膜、18：西洋ワサビペルオキシターゼを含むオスミウムポリビニルピリジン膜、19：銀、21：サンプリングキャピラリー、22：矩型流路を形

成したガラス基板、23：アウトレット用ヒューズドシリカキャピラリー、24：内部を塞いだキャピラリー、31：作用電極、32：参照電極、33：対向電極、34：薄層流路のためのレジストボタン、35：パッド、41：作用電極、42：参照電極、43：対向電極、44：HRPを含むポリビニルピリジン誘導体膜、及びコリン酸化酵素、アセチルコリンエステラーゼを固定化した牛血清アルブミン膜、45：銀、46：コリン酸化酵素、及びカタラーゼを固定したアルブミン膜、51：スライドガラス、52：ポリスチレン膜、53：矩型の溝、54：マイクロダイヤリシスプローブ、55：ガラス基板、56：レジストボタン、57：白金/チタン積層膜、58：薄層流路を構成するレジストボタン、59：酵素膜、60：銀、61：グルコース酸化酵素で修飾した白金薄膜作用電極、62：ラクトース酸化酵素で修飾した白金薄膜作用電極、63：参照電極、64：対向電極、65：薄層流路のためのレジストボタン、71：作用電極、72：参照電極、73：対向電極、74：薄層流路のためのレジストボタン、75：サンプリング用キャピラリー、76：電気浸透流発生のための薄膜電極、77：高電圧源、78：出口用キャピラリー

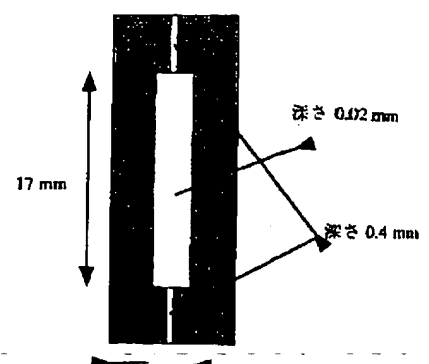
【図1】



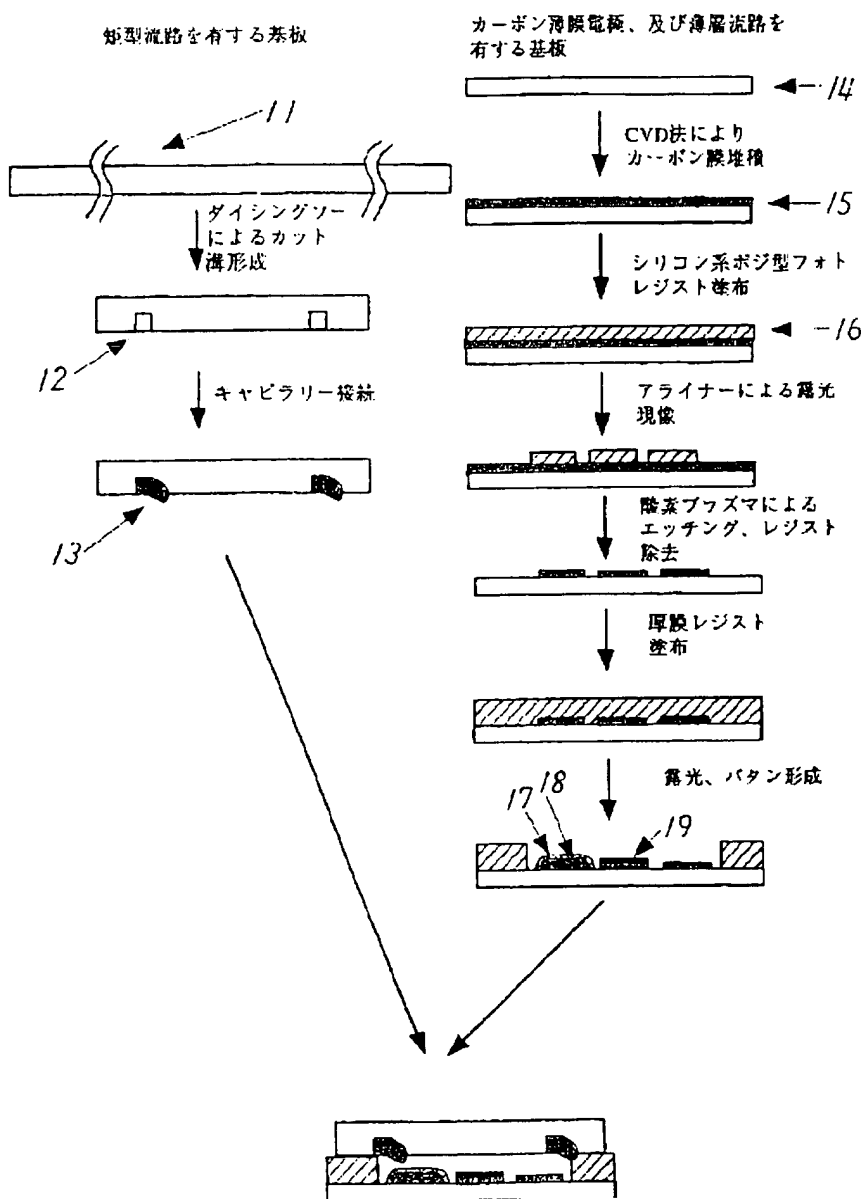
【図9】



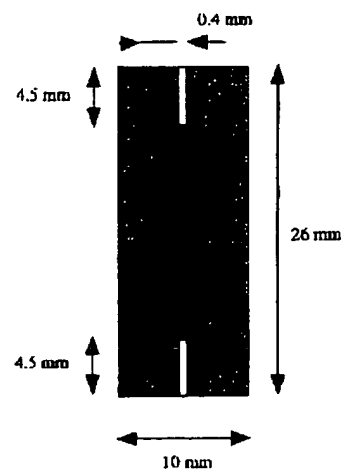
【図12】



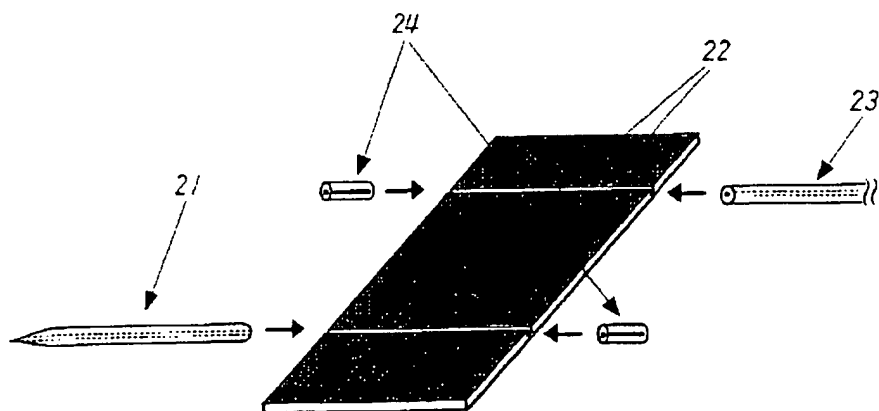
【図2】



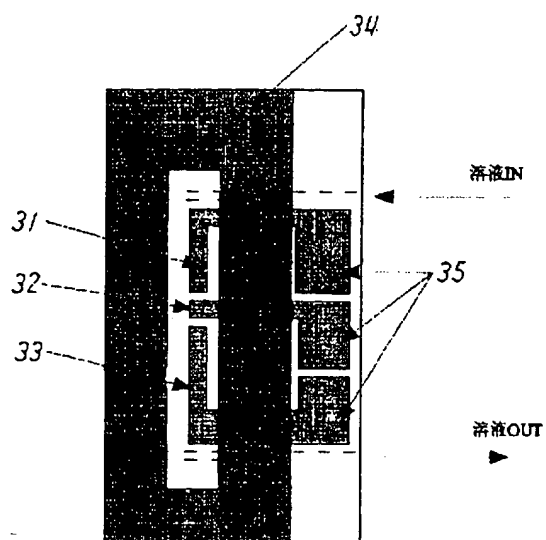
【図11】



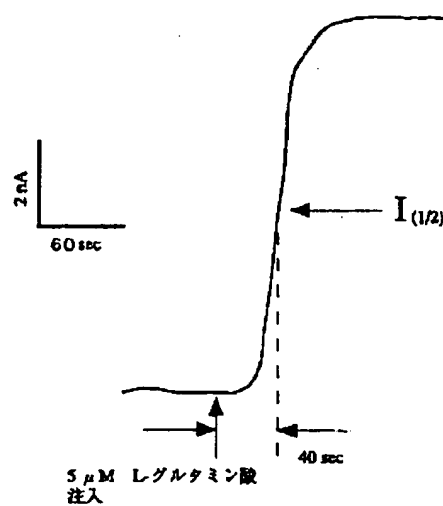
【図3】



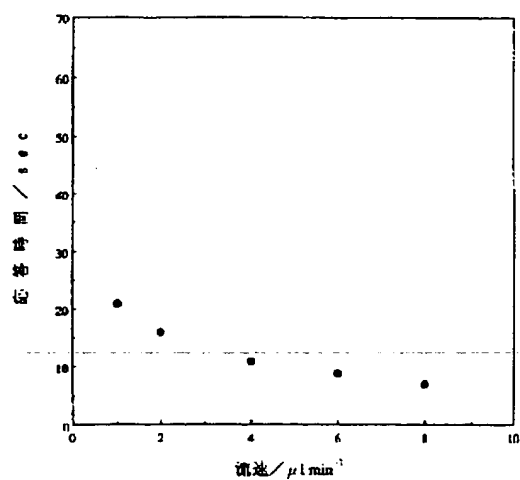
【図4】



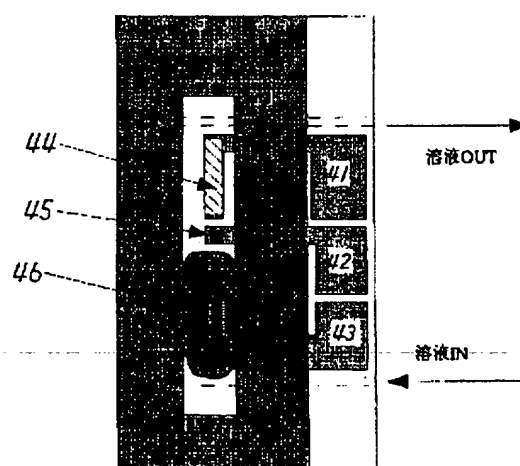
【図5】



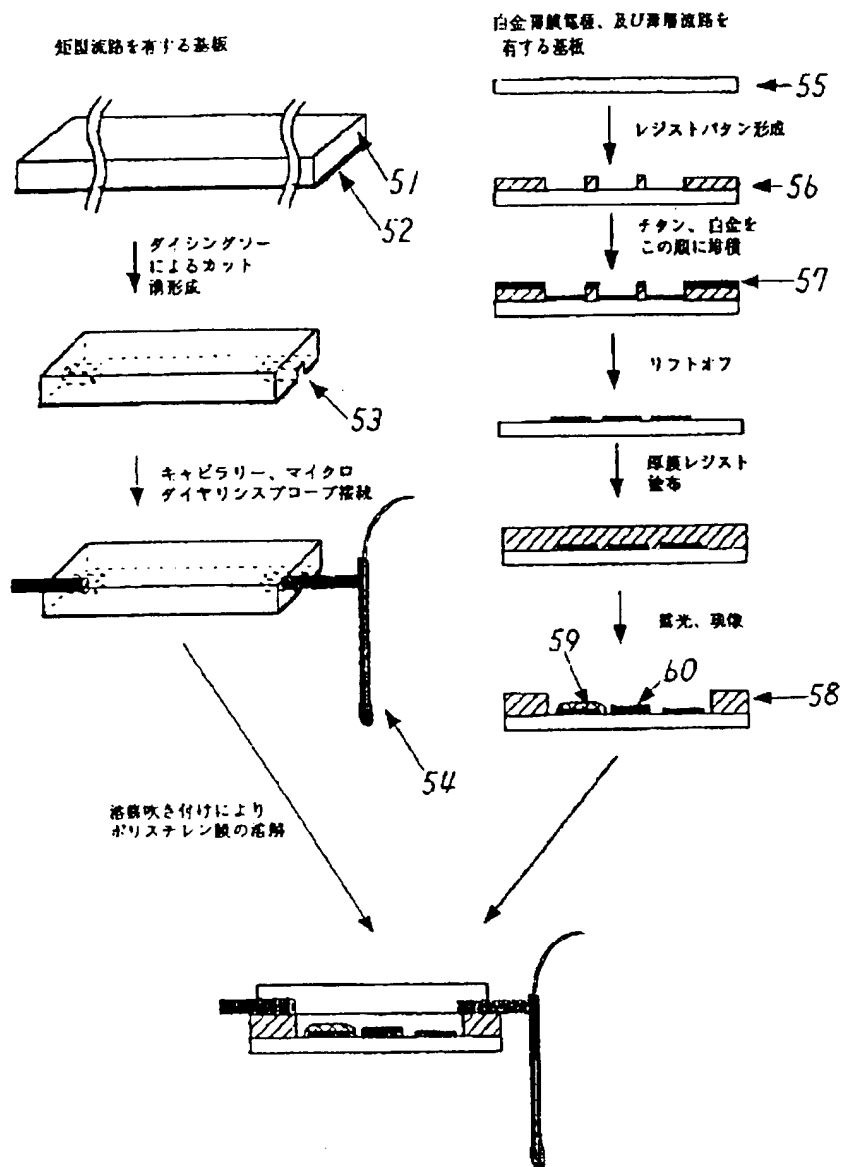
【図6】



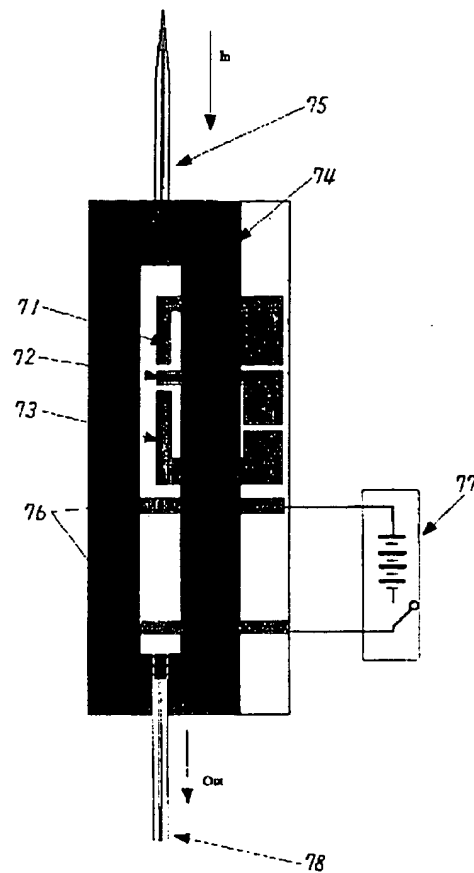
【図7】



【図8】



【図10】



フロントページの続き

(72)発明者 堀内 勉  
東京都新宿区西新宿三丁目19番2号 日本  
電信電話株式会社内

(72)発明者 烏光 慶一  
東京都新宿区西新宿三丁目19番2号 日本  
電信電話株式会社内

(72)発明者 森田 雅夫  
東京都新宿区西新宿三丁目19番2号 日本  
電信電話株式会社内

(72)発明者 田部井 久男  
東京都武蔵野市御殿山一丁目1番3号 エ  
ヌ・ティ・ティ・アドバンステクノロジ株  
式会社内

(72)発明者 佐久間 綾子  
東京都武蔵野市御殿山一丁目1番3号 エ  
ヌ・ティ・ティ・アドバンステクノロジ株  
式会社内

(72)発明者 栗田 僚三  
東京都武蔵野市御殿山一丁目1番3号 エ  
ヌ・ティ・ティ・アドバンステクノロジ株  
式会社内

## Patent Abstracts of Japan

AL

PUBLICATION NUMBER : 11083784  
PUBLICATION DATE : 26-03-99

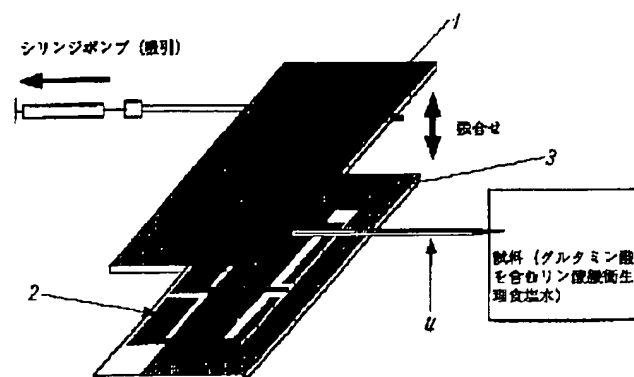
APPLICATION DATE : 03-09-97  
APPLICATION NUMBER : 09252642

APPLICANT : N T T ADVANCE TECHNOL KK;

INVENTOR : KURITA RIYOUJI;

INT.CL. : G01N 27/28 C12Q 1/00 G01N 27/327  
H01L 49/00

TITLE : MICROQUANTITY ONLINE  
BIOSENSOR AND MANUFACTURE  
THEREOF



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To enable forming of a microsensor with a higher sensitivity which is built by laminating an insulating substrate on which a fine passage comprising a rectangular groove on a thin layer and an electrochemical cell formed on another substrate.

SOLUTION: This microquantity online biosensor is so arranged to laminate an insulating substrate on which a fine passage comprising a rectangular groove is formed and a thin layer electrochemical cell formed on another substrate. A flowcell and a capillary for sampling or a microdialysis probe are connected to the fine passage. For example, the sensor is so arranged to laminate a substrate having a rectangular groove which is formed by micromachine technique, a thin film electrode 2 modified by enzyme or the like and a thin layer type resist film 3 formed surrounding it. This facilitates the connection of a capillary 4 for sampling and the microdialysis probe at an outlet/inlet.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

**This Page Blank (uspto)**